

107507550

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/001231

International filing date: 28 January 2005 (28.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-024815
Filing date: 30 January 2004 (30.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 March 2005 (24.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in
compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

01.2.2005

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 1月30日

出願番号
Application Number: 特願2004-024815

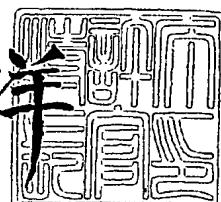
[ST. 10/C]: [JP2004-024815]

出願人
Applicant(s): 角田 愛美
東レ株式会社

2005年 3月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 4-1003709
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61M 1/02
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都世田谷区下馬 3-20-10
 【氏名】 角田 愛美
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県金沢区長浜 2-23-2
 【氏名】 春日井 昇平
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都千代田区四番町 8-4-109
 【氏名】 秋吉 一成
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都多摩市桜ヶ丘 4-32-7
 【氏名】 岩崎 泰彦
【特許出願人】
 【識別番号】 502281493
 【氏名又は名称】 角田 愛美
【代理人】
 【識別番号】 100088904
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 庄司 隆
【選任した代理人】
 【識別番号】 100124453
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 資延 由利子
【選任した代理人】
 【識別番号】 100129160
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 古館 久丹子
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 067070
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

血液に有機リン酸化合物の残基を有するポリマーを添加することによる血小板多血漿の調製方法。

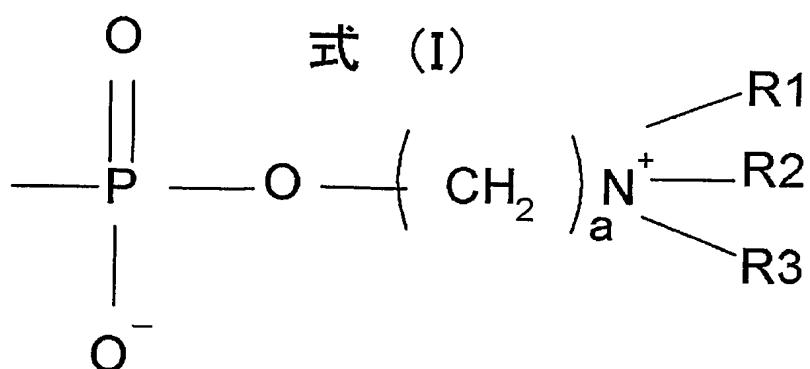
【請求項 2】

血液に有機リン酸化合物の残基を有するポリマーを添加し、赤血球を選択的に沈降させる工程を含む血小板多血漿の調製方法。

【請求項 3】

有機リン酸化合物の残基を有するポリマーとして、以下の式(I)：

【化1】

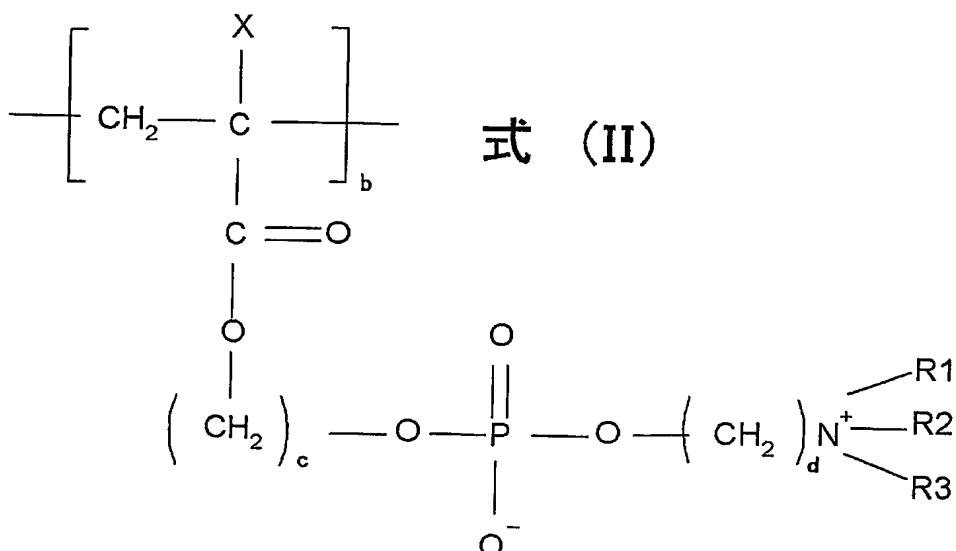


(式中、R 1、R 2 およびR 3 はそれぞれ独立に炭素数が1～8の直鎖または分岐のアルキル基で、aは1～12の整数である。)で示される基を側鎖に有する化合物を含む請求項1または2に記載の血小板多血漿の調製方法。

【請求項 4】

有機リン酸化合物の残基を有するポリマーとして、以下の式(II)：

【化2】

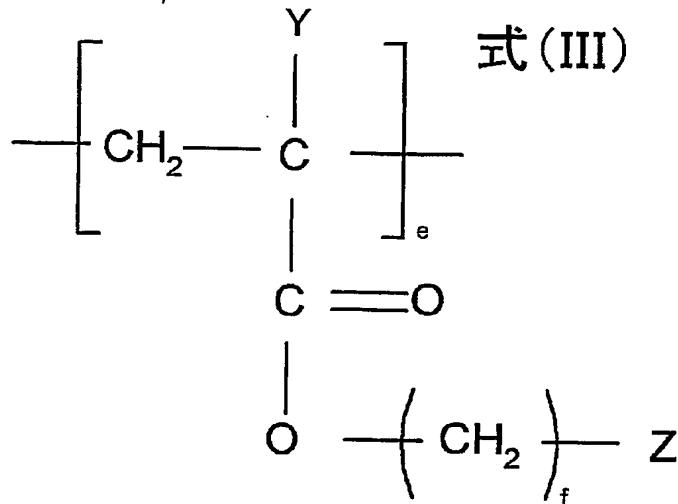


(式中、Xは-Hまたは-CH3、R 1、R 2 およびR 3 はそれぞれ独立に炭素数が1～8の直鎖または分岐のアルキル基で、bは1～4000の整数、cは1～6の整数、dは1～12の整数である。)で示される化合物を含む請求項3に記載の血小板多血漿の調製方法。

【請求項 5】

有機リン酸化合物の残基を有するポリマーとして、さらに以下の式(III)：

【化3】

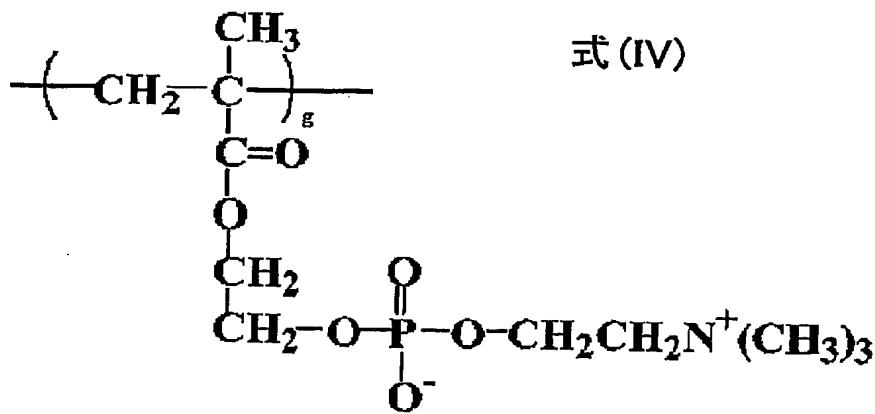


(式中、Yは-Hまたは-CH₃、Zは-H、-OH、-COOH、-COONa、-COOK、-SO₃H、-SO₃Na、-SO₃K、-NH₂、-NHR₁、-NR₁R₂、-N⁺R₁R₂R₃O⁻、-N⁺R₁R₂R₃SO₃⁻、-N⁺R₁R₂R₃NO₃⁻、-N⁺R₁R₂R₃PO₃⁻〔R₁、R₂、R₃は各々-(CH₂)_xH、xは1～5の整数〕、-O-PO₃Na、-O-PO₃K、-O-PO₃H、-OR₄H、-COOR₄H、-C=O-R₄H、〔R₄は脂肪族炭化水素、炭化水素の数0～20〕または-O-R₅〔R₅は芳香族炭化水素基〕、eは1～4000の整数、fは0～20の整数)で示される化合物を含む請求項1～4のいずれか1に記載の血小板多血漿の調製方法。

【請求項6】

有機リン酸化合物の残基を有するポリマーとして、以下の式(IV)：

【化4】

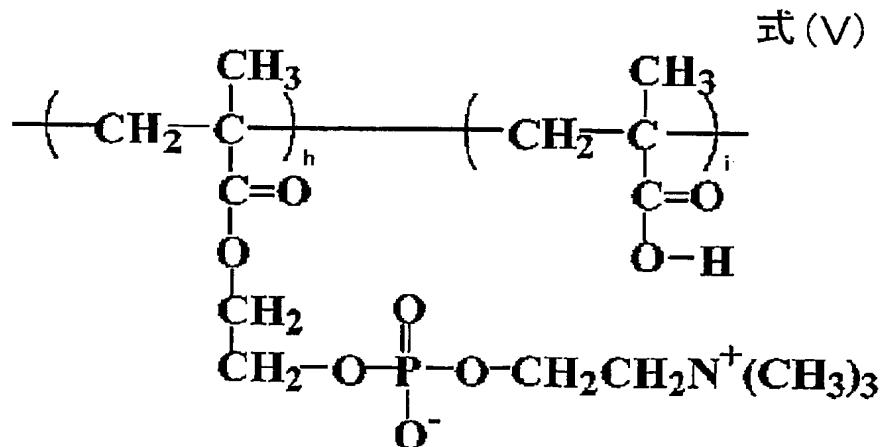


(式中、gは1～4000の整数)で示される化合物を含む請求項4または5に記載の血小板多血漿の調製方法。

【請求項7】

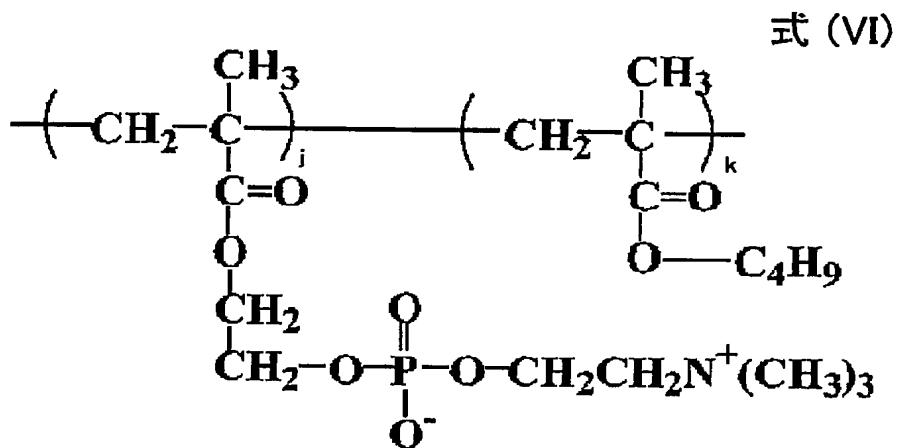
有機リン酸化合物の残基を有するポリマーとして、以下の式(V)～式(VII)のいずれか：

【化5】



(式中、h, i はそれぞれ独立に1～4000の整数)

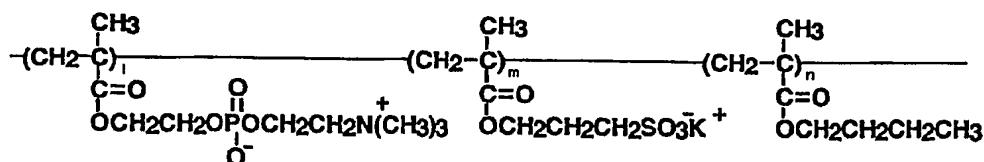
【化6】



(式中、j, k はそれぞれ独立に1～4000の整数)

【化7】

式(VII)



(式中、l, m, n はそれぞれ独立に1～4000の整数) で示される化合物を含む請求項3～6のいずれか1に記載の血小板多血漿の調製方法。

【請求項8】

請求項1～7のいずれか1に記載する調製方法により得られた血小板多血漿。

【請求項9】

請求項8に記載の血小板多血漿を含む組織および／または器官修復促進剤。

【請求項10】

請求項8に記載の血小板多血漿を含む組織および／または器官修復促進剤、歯科インプラント周囲の骨造成の添加剤、骨欠損部への骨もしくは人工骨の移植の際の添加剤、創傷治癒促進剤、形成および／または美容を目的とした治療後もしくは処置後の組織治癒促進剤、皮膚疾患治療剤、皮膚潰瘍治療剤、神経組織修復剤および／または外科手術後の組織修復剤。

【請求項11】

請求項8に記載の血小板多血漿を投与することによる以下に示すいずれかの治疗方法または処置方法：

- 1) 歯科インプラント周囲の骨造成
- 2) 皮膚疾患
- 3) 形成および／または美容のための組織修復
- 4) 骨欠損部修復
- 5) 神経組織修復
- 6) 外科手術後の組織修復

【請求項12】

請求項8に記載の血小板多血漿を調製するためのポリマー。

【請求項13】

請求項12に記載のポリマーを含む血小板多血漿調製用試薬または試薬キット。

【請求項14】

請求項8に記載の血小板多血漿を調製するための器具。

【書類名】明細書

【発明の名称】血小板多血漿からなる組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、医療の分野で使用される血小板多血漿およびその調製方法に関する。

【背景技術】

【0002】

現在、失われた組織の再生の分野において、医学、工学はますます進歩を遂げている。

しかし、近年、医療用として使われている血液製剤や、動物（特に牛）から作製された生理的活性物質を使用することで、それらに混入するウイルス、ブリオン等による感染により、安全を脅かされる事件が多数おこっており、社会的問題となっている。このようなことから、医療すべてに対する安全性について、非常に関心が高まっている。

また、日常の臨床応用の場においては、安全というだけでなく、その操作が確実、簡便なこともまた、重要なことである。

【0003】

こういった背景から、以前から術後の止血、創傷治癒促進剤として効果が認められてきたフィブリン製剤から発展させ、自己の血液成分を用いて、創傷治癒を早めるという治療方法が脚光を浴びるようになってきた。例えば、活性化された血小板は、創傷治癒早期において、細胞の遊走、分化を誘導する物質を分泌するため、手術の前に、自己の血液より血小板を濃縮した血漿（血小板多血漿：platelet-rich plasma（以下単に「PRP」という場合がある。））を作っておき、術部に血小板を活性化させたPRPを塗布して、治癒の促進を図ろうというものである。多数の臨床家によって、この方法による創傷治癒の促進が図られたという報告がなされるようになった。

【0004】

この方法は、自己の血液を使うという非常に安全な方法の上に、ある程度の確実な成績が得られるものの、操作法の複雑さ、危険性、手間、熟練した人手を必要とすることおよび高価な器具の購入、保守経費の増大等の問題点がある。

【0005】

血小板多血漿の調製方法や、血液を成分に分離する方法および装置等はすでに多く報告されている（特許文献1）。臨床検査用の血小板多血漿は、前腕正中静脈より採血し、3.1w/v%クエン酸ナトリウムを1.5mL含むプラスチックチューブに全血を4.5mLずつ加え、転倒混和したものを500g 15分間22℃で遠心した上清により得られる（非特許文献1）。しかし、従来の遠心分離法によると、操作が煩雑であり、赤血球を沈降させることができても、全血中に含まれる白血球などの血液成分やフィブリノゲン等の成分も遠心分離されてしまう。以下、便宜上従来法によって得られた血小板多血漿を「PRP」とよび、本発明の血小板多血漿と区別する。

【0006】

全血から赤血球細胞を分離して白血球の豊富な血漿（LRP）を得るために、連鎖形成凝集剤およびエンハンサーを全血に加える方法は開示されている（特許文献2）。ここでは、連鎖形成凝集剤としては、例えばデキストラン、ヘスペン、ペニタスパン、フィコールなどが例示されており、エンハンサーとしてシュウ酸の塩、マロン酸の塩、マンニトールおよびスクロースなるなどが例示されている。

【0007】

術後の止血、創傷治癒促進剤として使用する血小板多血漿は、血小板成分のみならず、フィブリノゲンを多く含む血漿成分や白血球を含めた血液成分を含むことが望ましく、このような活性の高い血小板多血漿が望まれている。

【0008】

従来得られた血小板多血漿は、遠心分離または血液から血球を沈殿させることにより得られたものであっても、血小板活性が既に亢進しており、組織および／または器官修復促進剤として使用するには、塩化カルシウムやトロンビン等の凝固反応誘導剤を使用するこ

とが必要であった。

【特許文献1】特開平5-203639号公開公報

【特許文献2】特表平8-510322号公表公報

【非特許文献1】臨床検査法提要第31版第400頁

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の課題は、組織および／または器官修復促進剤として血小板多血漿を使用する場合に、塩化カルシウムやトロンビン等の凝固反応誘導剤の使用を必要としない、効果のある活性の高い血小板多血漿を容易にかつ安価に提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は、鋭意検討を重ねた結果、有機リン酸化合物の残基を有するポリマーを全血に添加して選択促進的に赤血球を凝集沈降させて得た血小板多血漿は、生体内での血小板に近いインタクトな血小板を含み、塩化カルシウムやトロンビン等の凝固反応誘導剤を使用することなく組織および／または器官修復促進剤として使用できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0011】

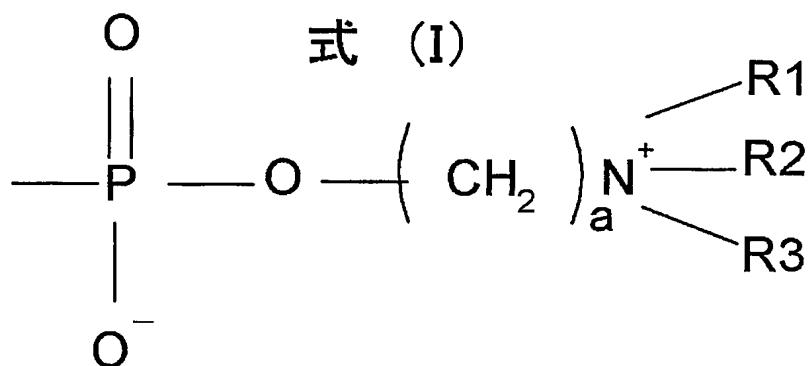
すなわち本発明は、以下からなる。

1. 血液に有機リン酸化合物の残基を有するポリマーを添加することによる血小板多血漿の調製方法。

2. 血液に有機リン酸化合物の残基を有するポリマーを添加し、赤血球を選択的に沈降させる工程を含む血小板多血漿の調製方法。

3. 有機リン酸化合物の残基を有するポリマーとして、以下の式(I)：

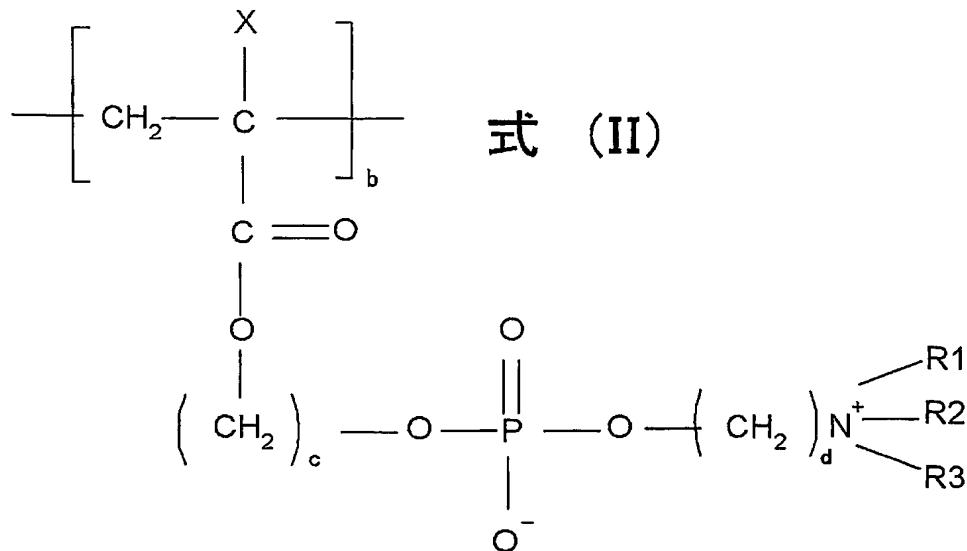
【化1】



(式中、R 1、R 2 およびR 3 はそれぞれ独立に炭素数が1～8の直鎖または分岐のアルキル基で、a は1～12の整数である。) で示される基を側鎖に有する化合物を含む前項1または2に記載の血小板多血漿の調製方法。

4. 有機リン酸化合物の残基を有するポリマーとして、以下の式(II)：

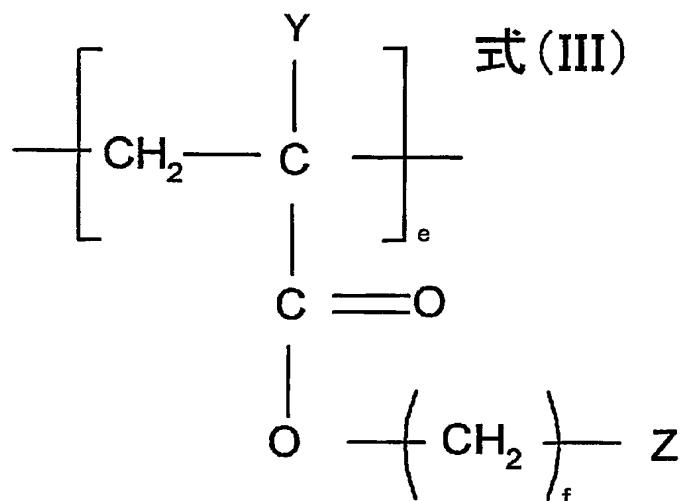
【化2】



(式中、Xは-Hまたは-CH₃、R₁、R₂およびR₃はそれぞれ独立に炭素数が1～8の直鎖または分岐のアルキル基で、bは1～4000の整数、cは1～6の整数、dは1～12の整数である。)で示される化合物を含む前項3に記載の血小板多血漿の調製方法。

5. 有機リン酸化合物の残基を有するポリマーとして、さらに以下の式(III)：

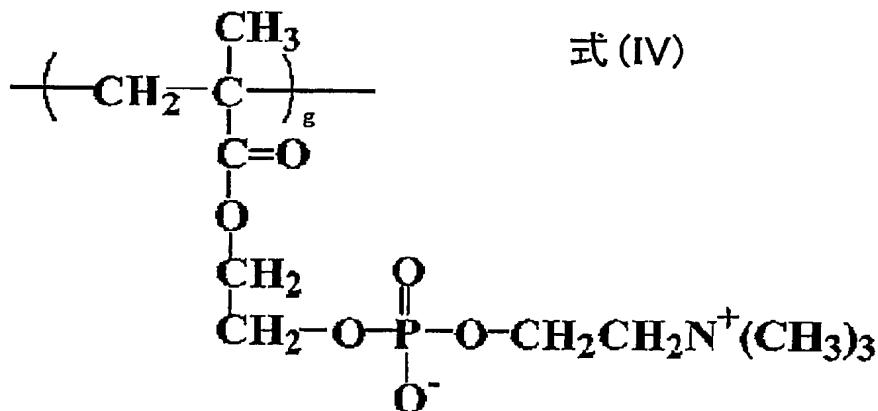
【化3】



(式中、Yは-Hまたは-CH₃、Zは-H、-OH、-COOH、-COONa、-COOK、-SO₃H、-SO₃Na、-SO₃K、-NH₂、-NHR₁、-NR₁R₂、-N⁺R₁R₂R₃O⁻、-N⁺R₁R₂R₃SO₃⁻、-N⁺R₁R₂R₃NO₃⁻、-N⁺R₁R₂R₃PO₃⁻〔R₁、R₂、R₃は各々-(CH₂)_xH、xは1～5の整数〕、-O-PO₃Na、-O-PO₃K、-O-PO₃H、-OR₄H、-COOR₄H、-C=O-R₄H、〔R₄は脂肪族炭化水素、炭化水素の数0～20〕または-O-R₅〔R₅は芳香族炭化水素基〕、eは1～4000の整数、fは0～20の整数)で示される化合物を含む前項1～4のいずれか1に記載の血小板多血漿の調製方法。

6. 有機リン酸化合物の残基を有するポリマーとして、以下の式(IV)：

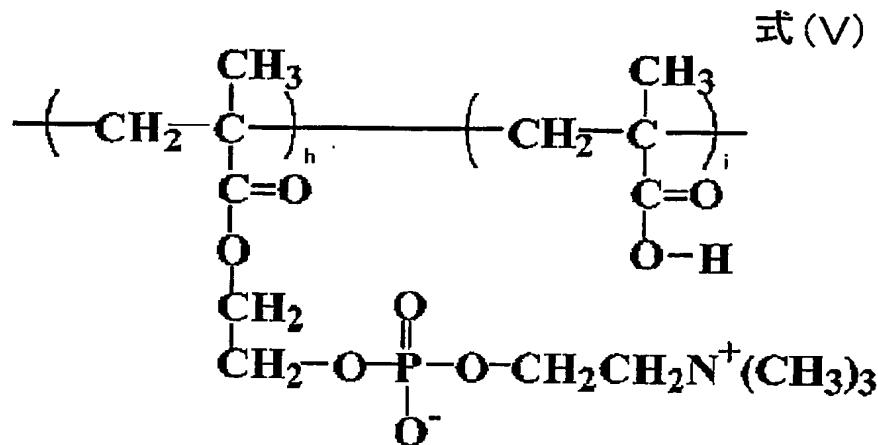
【化4】



(式中、gは1～4000の整数)で示される化合物を含む前項4または5に記載の血小板多血漿の調製方法。

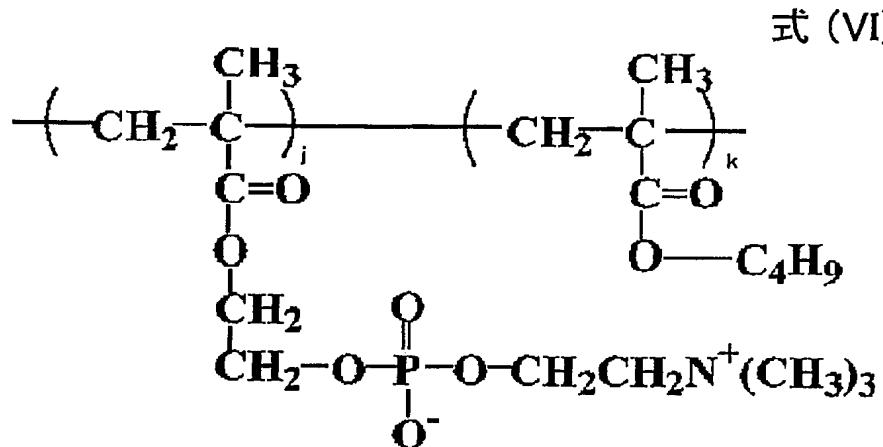
7. 有機リン酸化合物の残基を有するポリマーとして、以下の式(V)～式(VII)のいずれか：

【化5】



(式中、h, iはそれぞれ独立に1～4000の整数)

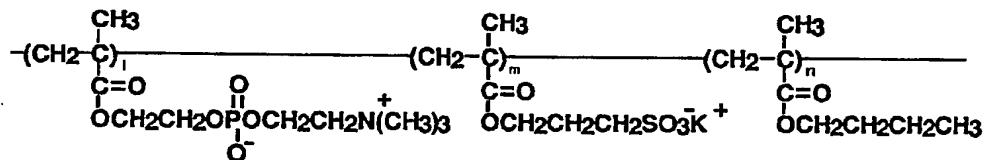
【化6】



(式中、 j , k はそれぞれ独立に 1 ~ 4 0 0 0 の整数)

【化7】

式 (VII)



(式中、 l , m , n はそれぞれ独立に 1 ~ 4 0 0 0 の整数) で示される化合物を含む前項 3 ~ 6 のいずれか 1 に記載の血小板多血漿の調製方法。

- 8 . 前項 1 ~ 7 のいずれか 1 に記載する調製方法により得られた血小板多血漿。
- 9 . 前項 8 に記載の血小板多血漿を含む組織および／または器官修復促進剤。
- 10 . 前項 8 に記載の血小板多血漿を含む組織および／または器官修復促進剤、歯科インプラント周囲の骨造成の添加剤、骨欠損部への骨もしくは人工骨の移植の際の添加剤、創傷治癒促進剤、形成および／または美容を目的とした治療後もしくは処置後の組織治癒促進剤、皮膚疾患治療剤、皮膚潰瘍治療剤、神経組織修復剤および／または外科手術後の組織修復剤。

11 . 前項 8 に記載の血小板多血漿を投与することによる以下に示すいずれかの治疗方法または処置方法：

- 1) 歯科インプラント周囲の骨造成
- 2) 皮膚疾患
- 3) 形成および／または美容のための組織修復
- 4) 骨欠損部修復
- 5) 神経組織修復
- 6) 外科手術後の組織修復

12 . 前項 8 に記載の血小板多血漿を調製するためのポリマー。

13 . 前項 12 に記載のポリマーを含む血小板多血漿調製用試薬または試薬キット。

14 . 前項 8 に記載の血小板多血漿を調製するための器具。

【発明の効果】

【0012】

本発明の有機リン酸化合物の残基を有するポリマーを血液に添加すると、赤血球が他の血球よりも選択的に凝集沈降し、損傷が少なく限りなくインタクトな状態の血小板を含む血小板多血漿が得られるため、組織および／または器官修復促進剤として有効に使用することができる。さらに本手法で取得した血小板多血漿の使用にあたっては、特にカルシウムやトロンビン等の凝固反応誘導剤を減じたり、場合によっては使用しないことも可能である。

【発明を実施するための最良の形態】**【0013】**

血小板は損傷した内皮下組織に粘着・凝集して血栓を形成し、止血に際して、また、他の細胞を遊走、分化誘導する物質の貯蔵、放出に関して、非常に重要な役割を果たしている。フィブリノゲンは、血漿中のフィブリノゲンにトロンビンが作用して生じるもので、血液凝固の最終段階に関わるものである。さらに、組織修復のために細胞が浸潤し細胞分化するための足場としても重要である。また、白血球は細菌や有害な微生物などの侵入を防ぐ働きがあり、免疫機能や殺菌機能を有し、損傷組織を保護することで組織修復を促進する。白血球のなかでも単球／マクロファージは、組織修復にも重要な役割を担っていることが知られている。

【0014】

血小板は、刺激や採血からの時間の経過とともに急速に機能が失われる。このため、血小板に対する刺激が少なく短時間に分離可能な遠心分離以外の手法では、高い機能を保持した血小板を得ることは不可能であった。全血を静置すると次第に赤血球が沈降するが、通常この速度は非常に遅いため、高度の炎症反応時などの病的な血液以外では、数時間以上放置しても血小板を含む血漿は得られないことが知られている。

【0015】

本発明の血小板多血漿の調製方法によって、全血から選択促進的に赤血球を沈降させることができ、上清中に血小板ばかりか白血球、フィブリノゲンなどの組織修復に不可欠な成分を保持したまま得ることができる。さらに、本発明により得られた血小板多血漿は、損傷が軽減された限りなくインタクトな状態の血小板を含む。限りなくインタクトな状態の血小板は、高い成長因子の放出能が維持され、高い止血、凝血効果が得られる等の特徴を有し、このような血小板を含む多血漿は優れた品質を有する。

【0016】

本発明においては、選択促進的に赤血球を凝集沈降させることができ、処理開始後3時間以内、好ましくは2時間以内、より好ましくは1時間以内、更に好ましくは30分以内に、全血に含まれる赤血球を80%以上好ましくは90%以上を凝集させることによって沈降させ、全血液量の少なくとも15%以上の血小板多血漿を得ることができる。

【0017】

本発明の血小板多血漿の調製に使用する全血は、ヒトまたはヒトを除く動物において、通常採血する方法に従って取得すればよい。また、採血した全血はそのままでは凝固してしまうため、採血後抗凝固剤を予め加えておくことが望ましい。抗凝固剤としては、通常使用されているものであって、生体に対して毒性を示さないものであればよく、例えば、クエン酸ナトリウム、ACD、EDTA、ヘパリン、低分子ヘパリン、フサン、ヒルジン、アルガトロバンなど、一般的に使用されるものであれば良い。

【0018】

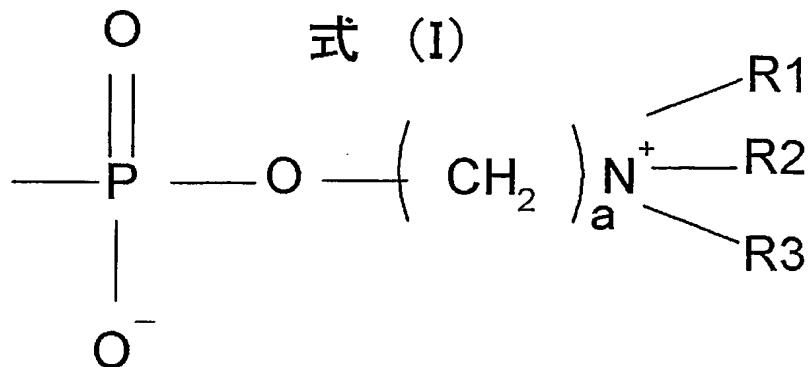
本発明の血小板多血漿調製のための処理血液の量は特に制限されずその用途によって異なり、使用目的、使用量に応じて適切な量を選択することができる。本発明の方法は、例えば、自己の血液を採血したものについて適用させることができ、献血などで得られた血液にも適用させることができる。本発明は、このように高い活性を有する血小板を簡便に得る方法があるので、血小板製剤の調製にも用いることができる。

【0019】

(有機リン酸化合物の残基を有するポリマー)

全血から選択促進的に赤血球を凝集沈降させるために、有機リン酸化合物の残基を有するポリマーを全血に添加することができる。有機リン酸化合物の残基を有するポリマーとして、式(I)：

【化8】



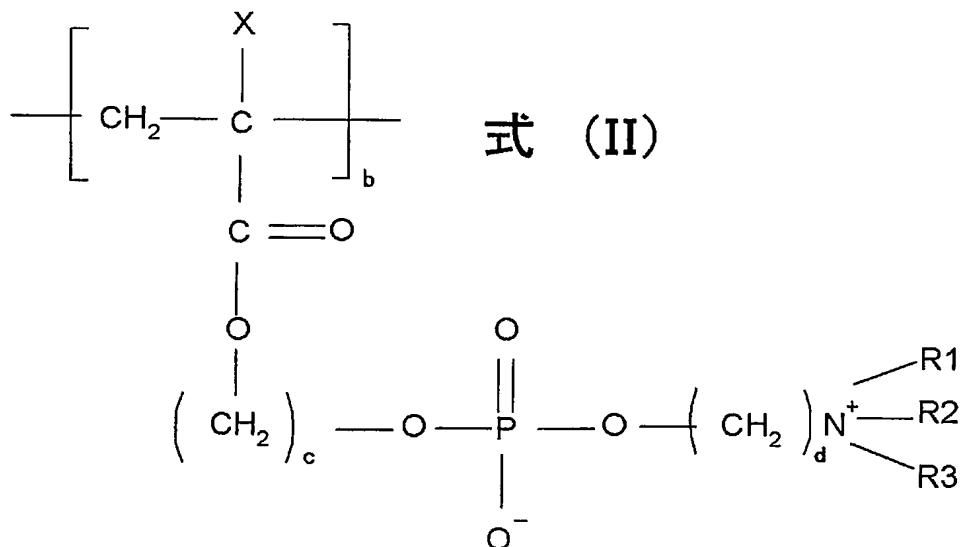
【0020】

(式中、R 1、R 2 およびR 3 はそれぞれ独立に炭素数が1～8の直鎖または分岐のアルキル基で、aは1～12の整数である。) で示される基を側鎖として含む化合物を構成単位に含めることができる。

【0021】

有機リン酸化合物の残基を有するポリマーとして、具体的には式(II)：

【化9】



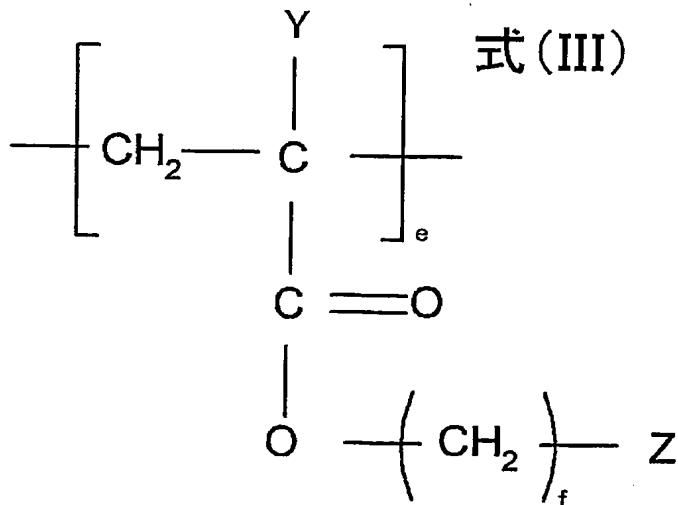
【0022】

(式中、Xは-Hまたは-CH₃、R 1、R 2 およびR 3 はそれぞれ独立に炭素数が1～8の直鎖または分岐のアルキル基で、bは1～4000の整数、cは1～6の整数、dは1～12の整数である。) に示す化合物を含めることができる。

【0023】

また、本発明に使用するポリマーは、式(II)から選択される1の化合物のみを構成単位とするホモポリマーであってもよいし、式(II)から選択される2以上の化合物を構成単位として含むヘテロポリマーであっても良い。さらに、他の構成単位を含むヘテロポリマーであっても良い。具体的には、式(III)：

【化10】



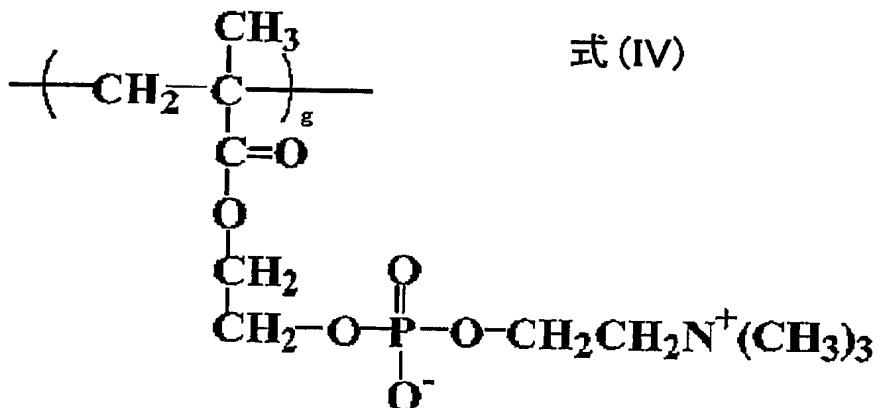
【0024】

(式中、Yは-Hまたは-CH₃、Zは-H、-OH、-COOH、-COONa、-COOK、-SO₃H、-SO₃Na、-SO₃K、-NH₂、-NHR₁、-NR₁R₂、-N⁺R₁R₂R₃OH⁻、-N⁺R₁R₂R₃SO₃⁻、-N⁺R₁R₂R₃NO₃⁻、-N⁺R₁R₂R₃PO₃⁻〔R₁、R₂、R₃は各々-(CH₂)_xH、xは1～5の整数〕、-O-PO₃Na、-O-PO₃K、-O-PO₃H、-OR₄H、-COOR₄H、-C=O-R₄H、〔R₄は脂肪族炭化水素、炭化水素の数0～20〕または-O-R₅〔R₅は芳香族炭化水素基〕、eは1～4000の整数、fは0～20の整数)に示すメタクリラート化合物を含んでいても良い。

【0025】

本発明に使用するポリマーは具体的にはメタクリル系ポリマーを例示することができ、例えば式(IV)：

【化11】



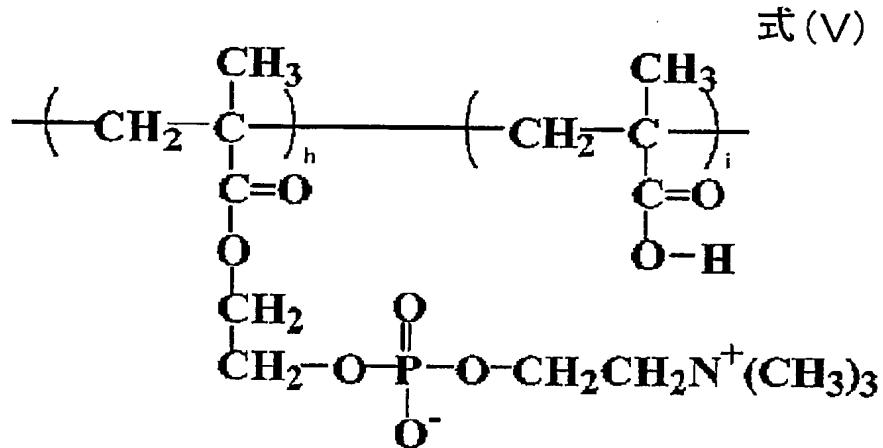
【0026】

(式中、gは1～4000の整数)に示す2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine(MPC))若しくはその誘導体を含んでいても良い。

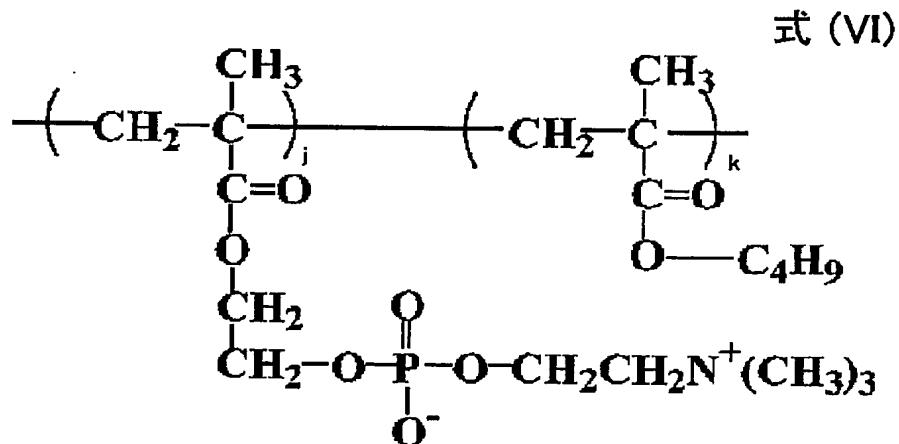
【0027】

本発明に使用するヘテロポリマーの例として、次の式(V)および／または(VI)：

【化12】



【化13】



【0028】

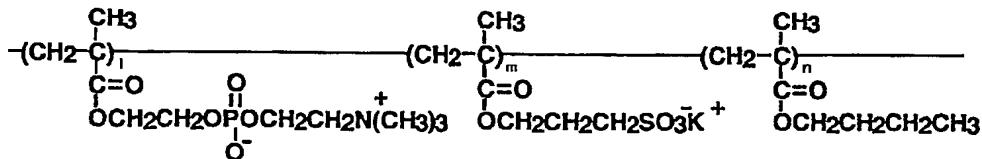
(式中、 h 、 i および j 、 k はそれぞれ独立に1～4000の整数)に示す化合物を含めることができる。例えば、式(V)および(VI)に示された各々2種の構成化合物の割合は適宜選択することができ、例えば2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)とメタクリラート化合物の構成比を7:3、8:2、9:1等と適宜選択することができる。

【0029】

また、本発明に使用するヘテロポリマーの例として次の式(VII)：

【化14】

式 (VII)



【0030】

(式中、1, m, nはそれぞれ独立に1～4000の整数)で示される化合物を含めることもでき、示された3種の構成化合物の割合も適宜選択することができる。式(VII)のPMSBに含まれる2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC), カリウム3-メタクリロイルオキシプロピルスルホナート(Potassium 3-Methacryloyloxypropyl sulfonate(PMPS))およびn-ブチルメタクリラート(BMA)の構成比は、例えば25:20:55, 45:5:50, 41:4:55等と適宜選択することができる。尚、本明細書において、PMSB25はMPC:PMPS:BMAの構成比が25:20:55のものを意味し、PMSB45はMPC:PMPS:BMAの構成比が45:5:50のものを意味する。

【0031】

本発明で使用できるポリマーの平均分子量としては、好ましくは1000～500万の範囲であり、より好ましくは1000～100万である。

【0032】

(血小板多血漿の調製方法)

本発明の血小板多血漿を調製するために、抗凝固剤を含む血液量1.5mLに対して、上記有機リン酸化合物の残基を有するポリマーを、0.0015～150mg、好ましくは0.15～45mg、より好ましくは1.5～4.5mg添加することができる。換算すると、約0.0001～10w/v%、好ましくは0.01～3w/v%、より好ましくは0.1～0.3w/v%となる。より多量の血小板多血漿を調製する場合には、血液量を増加し、上記と同じ割合で有機リン酸化合物の残基を有するポリマーを添加することができる。上記有機リン酸化合物の残基を有するポリマーは、採血した血液を入れる容器に加えておくこともできるし、採血用注射筒に直接加えておくこともできる。

【0033】

上記の範囲から選択される量のポリマーを、抗凝固剤を含む血液に添加し、該化合物が血液全体にいきわたるように静かに混和後、静置しておくことにより選択促進的に赤血球の沈降が認められ、上清には血小板のみならず血漿成分や白血球等の血液成分を含む血小板多血漿を得ることができる。赤血球の沈降は、遅くとも3時間、好ましくは2時間以内で認められ、早ければ処理開始後10分程度で認められ、20分から30分程度で、本発明の目的の血小板多血漿を得ることができる。

また、赤血球の分離が不十分な場合やより短時間での分離が必要な場合には、従来の赤血球の凝集を引き起こさない程度の弱い遠心分離をさらに行うこともできる。具体的には、142Gで5分以下の遠心分離を加えることができる。

【0034】

(本発明の血小板多血漿の使用)

本発明の方法により調製された血小板多血漿は、創傷治癒剤、歯科インプラント周囲の骨造成の添加剤、骨欠損部への骨もしくは人工骨の移植の際の添加剤、創傷治癒促進剤、皮膚疾患治療剤、皮膚潰瘍治療剤、形成あるいは美容を目的とした治療もしくは処置後の組織治癒促進剤、外科手術後の組織修復剤、整形外科領域の術後の組織修復剤、神経組織修復剤などあらゆる組織、器官における治癒促進剤として適用することが可能である。つ

まり、本発明の血小板多血漿により、上記の疾患や皮膚もしくは組織の損傷等を治療することができる。

【0035】

本発明の血小板多血漿は、ヒトのみならず、ヒトを除く哺乳類にも適用することができる。哺乳類の例としては、特に地上に生息する動物が挙げられ、一般的にペットとして飼育されるイヌ、ネコ、ハムスター等にも適用することができる。また、競走馬や闘牛用ウシのように、スポーツにおいて活用される動物等に対しても適用することができる。

【0036】

本発明の方法により、自己の血液から調製された血小板多血漿は、上記の治療または処置の目的で使用することができる。また、血液型が適合すれば自己の血液由来でなくとも使用することももちろん可能である。

【0037】

使用方法として、具体的には創傷部位に本発明の血小板多血漿を必要量塗布する、注入する等の投与方法を適用することができる。

【0038】

(調製用試薬、器具ならびにキット)

本発明の血小板多血漿は、上述したように自己の血液から簡便かつ容易に、治療等に効果的な血小板多血漿を調製できることが最大の特徴である。簡便かつ容易に調製するためには、本発明の調製方法に使用する有機リン酸化合物の残基を有するポリマーを試薬として備えておくことにより達成される。

【0039】

具体的には上記「有機リン酸化合物の残基を有するポリマー」の欄で説明した各種のポリマーを、バイヤルやアンプル等の適当な容器に充填した試薬、これらの試薬を複数含むもの、あるいは溶解液などを含む試薬キットなども本発明に含まれる。さらに、本発明の調製方法に使用される器具、具体的には、採血に使用するシリングや採血管、さらには採血された血液に有機リン酸化合物の残基を有するポリマーを添加するための滅菌処理されたプラスチックなどの容器もしくは試験管などが挙げられる。本発明の血小板多血漿調製キットは、上記例示した試薬や器具から選択される試薬および器具をキット化したものが挙げられる。本キットを使用することで、採血したベッドサイド等で容易に本発明の血小板多血漿を容易に調製することができる。

【0040】

さらに、本発明の有機リン酸化合物の残基を有するポリマーを、採血の際に用いるシリングや容器にあらかじめ充填したものも好ましく用いられる。抗凝固剤として広く使用されるクエン酸ナトリウムやACDの中に、有機リン酸化合物の残基を有するポリマーを溶かし込んでおき、それを上述のシリングや容器に充填したものも特に好ましく用いられる。

【0041】

本発明は、上記方法によって調製された血小板多血漿にもおよび、さらに血小板多血漿を調製する目的で使用する本発明で特定されたポリマーにもおよぶ。

【実施例】

【0042】

以下、本発明を実施例および実験例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0043】

(実施例1)

本実施例は、全血（末梢血）に各種モノマーまたはポリマーを添加したときの、赤血球の沈降効果を確認することを目的とする。

【0044】

次の方法で9種の試料を調製した。抗凝固剤として、抗凝固クエン酸デキストロース（以下「ACD」、シグマ社製）を3.13w/v%混入したものをACD溶液とした。0.15mLに血液を1.35mL加え、全体を1.5mLとしたものを全血試料（コントロール）とした。

【0045】

本実施例において、試料4は式VIに記載するMPCおよびBMAを8:2の割合で含むヘテロポリマーPoly(MPC-co-BMA)(PMB(8:2))(分子量100000)、試料5は式IVに記載するMPCのみを構成単位とするホモポリマー(分子量100000)を使用した。ポリグルタミン酸はシグマ社製(分子量53,785)を使用した。

【0046】

試料1：コントロール

試料2：L-グルタミン酸 3mgをADC溶液0.15mLに溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料3：D-グルタミン酸 3mgをADC溶液0.15mLに溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料4：PMB(8:2) 3mgをADC溶液0.15mLに溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料5：PMPC 3mgをADC溶液0.15mLに溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料6：ポリグルタミン酸 0.1mgをADC溶液0.15mLに溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料7：ポリグルタミン酸 0.5mgをADC溶液0.15mLに溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料8：ポリグルタミン酸 0.7mgをADC溶液0.15mLに溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料9：ポリグルタミン酸 3mgをADC溶液0.15mLに溶かし、血液1.35mLと混合した。

【0047】

1) 赤血球の沈殿について

上記各試料を30分間静置した後の赤血球の沈降は、試料6～9のポリグルタミン酸を添加した試料と、試料4および5のMPCを含むポリマーを添加した試料では、ほぼ同等であった。

【0048】

2) 血小板数

各種試料を30分間静置した後の上清に含まれる白血球(WBC)、赤血球(RBC)、血小板(PLT)を計測した。計測は、日本光電株式会社製全自动血球測定器(Celltac α(MEC-6318))により行った。その結果を表1に示した。その結果、試料5のポリマーは試料6のポリグルタミン酸と同様に、白血球、血小板数が高い値を示した。

【表1】

	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6
WBC	65	94	89	124	140	140
RBC	397	63	4	6	13	5
PLT	17.3	43.9	48	26	41.6	37.4

【0049】

(実施例2)

本実施例は、式VIIに示すPMSBを添加する際に、抗凝固剤の添加の有無による赤血球の沈降状態を確認することを目的とする。

【0050】

次の方法で5種の試料を調製した。実施例1と同様にADC溶液に血液を1.35mL加え、全量を1.5mLとしたものを全血試料(コントロール)とした(試料1)。試料2～5は、各重量のPMSBをACD溶液またはハンクス液(インビトロゲン社製)に溶解したものを血液に添加し調製した。ここで、試料2および4のPMSB25は式VIIに記載するMPC、PMPS、BMAを2.5:20:55の割合で含むPMSB(分子量100000)であり、試料3および5のPMSB45は同様に式VIIに記載する化合物を45:5:50の割合で含むPMSB(分子量100000)である。以下の実施例についても同様である。

【0051】

試料1：コントロール

試料2：PMSB25 3mgを0.15mLのACD溶液に溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料3：PMSB45 3mgを0.15mLのACD溶液に溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料4：PMSB25 3mgを0.15mLのハンクス液に溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料5：PMSB45 3mgを0.15mLのハンクス液に溶かし、血液1.35mLと混合した。

【0052】

上記各試料を30分間静置した後は、試料2および3では赤血球の沈殿が認められ、上清に血小板多血漿を得ることができた。一方試料4および5の抗凝固剤を含まない系では試料が凝固してしまい、血小板多血漿を得ることはできなかった。

【0053】

(実施例3)

本実施例は、各PMSBを添加したときの効果を調べることを目的とする。

【0054】

実施例1および実施例2の方法と同様に次の4種の試料を調製した。

試料1：コントロール

試料2：ポリグルタミン酸 3mgを0.15mLのACD溶液に溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料3：PMSB25 3mgを0.15mLのACD溶液に溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料4：PMSB45 3mgを0.15mLのACD溶液に溶かし、血液1.35mLと混合した。

【0055】

上記各試料を30分間静置した後、試料2～4について赤血球の沈殿が認められ、上清に血小板多血漿を得ることができた。上記静置したときの上清中の白血球(WBC)、血小板数(PLT)、凝固時間および血小板活性(CD62P)を表2に示した。

CD62P(%Gated)は血小板内の分泌顆粒膜に内在する分子量140kdの糖蛋白質であり、血小板がひとたび活性化されると血小板の細胞膜表面に移行して発現するので血小板活性化の指標とされている。CD62Pは、BD Biosciences社製抗体をもちいてフローサイトメトリー法で測定した。

上記の結果、凝固に要する時間は、試料3および4については25～50分であり、試料2により得られた血小板多血漿と比較して優れた凝固能を示した。また、CD62P値については試料2については高値であり血小板活性の亢進が認められたが、試料3および4については低値であった。

【表2】

血球数

	試料1	試料2	試料3	試料4
WBC	83	112	153	170
PLT	19.2	34.3	41.7	41.8

凝固時間

	試料1	試料2	試料3	試料4
経過時間	——	90分後に凝固	50分	25分

CD62P (%Gated)

	試料1	試料2	試料3	試料4
%Gated	* * *	95.73	4.58	4.42

【0056】

(実施例4)

本実施例は、各PMSBを添加したときの効果を調べることを目的とする。

【0057】

実施例3と同様に次の4種の試料を調製した。

試料1：コントロール

試料2：ポリグルタミン酸 3mgを0.15mLのACD溶液に溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料3：PMSB25 3mgを0.15mLのACD溶液に溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料4：PMSB45 3mgを0.15mLのACD溶液に溶かし、血液1.35mLと混合した。

【0058】

上記各試料を30分間静置した後、試料2～4について赤血球の沈殿が認められ、上清に血小板多血漿を得ることができた。上記静置したときの上清中の白血球(WBC)、血小板数(PLT)および凝固時間を表2に示した。試料3および4について凝固に要する時間は、10～20分であり、試料2により得られた血小板多血漿と比較して優れた凝固能を示した。

【表3】

血球数

	試料1	試料2	試料3	試料4
WBC	89	138	161	160
PLT	22.1	41.6	45	46.4

凝固時間

	試料1	試料2	試料3	試料4
経過時間	——	35分	20分	10分

【0059】

(実施例5)

本実施例は、各種ポリマーを添加したときの効果を調べることを目的とする。

【0060】

次の5種の試料を調製した。ADCを水に3.13w/v%混入したADC溶液およびコントロール(試料1)は実施例1と同様に調製した。試料3および4は式IVに記載するMPCのみを構成単位とするホモポリマー(分子量100000)を使用し、試料5および6は試料4は式VIに記載するMPCおよびBMAを8:2の割合で含むヘテロポリマー(PMB(8:2))(分子量100000)を使用した。各種ポリマーを水に5w/v%となるように溶解したものをポリマー溶液とした。

【0061】

試料1：コントロール

試料2：ポリグルタミン酸3mgを0.15mLのADC溶液に溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料3：ポリマー溶液(PMPC) 0.06mLに3mgのポリグルタミン酸を添加し、0.09mLのADC溶液を加え、血液1.35mLと混合した。

試料4：ポリマー溶液(PMPC) 0.09mLのADC溶液を加え、血液1.35mLと混合した。

試料5：ポリマー溶液(PMB(8:2)) 0.06mLに0.09mLのADC溶液を加え、血液1.35mLと混合した。

試料6：ポリマー溶液(PMB(8:2)) 0.12mLに0.09mLのADC溶液を加え、血液1.29mLと混合した。

【表4】

血球

	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6
WBC	69	103	108	142	124	78
PLT	21.3	45.3	43.8	51.6	42.9	18

凝固時間

	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6
	***	35分では凝固せず。 その後凝固	10~35分	10分以内 (CaCl ₂ のみでも凝固)	10分以内 (CaCl ₂ のみでも凝固)	10分以内 (CaCl ₂ のみでも凝固)

CD62P (%Gated)

	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5	試料6
30分経過後	***	97.55	97.77	9.97	3.82	6.12
ポリグルタミン 添加後	***	***	90.5	92.58	94.46	95.41

【0062】

上記各試料を30分間静置したときの上清中の白血球(WBC)、血小板数(PLT)、凝固時間および血小板の活性(CD62P)を表4に示した。CD62Pは、ポリグルタミン酸を含む試料2および3では高い値を示したのに対し、試料4および試料5では低値を示すことが確認された。さらに、各試料について、赤血球を沈殿させて得られた血小板多血漿にさらにポリグルタミン酸を添加したところCD62Pの上昇が認められた。また、試料4および5により得られた血小板多血漿は10分以内で凝固したのに対し、ポリグルタミン酸を含む試料2および3では凝固に要する時間が長かった。

【0063】

(実施例6)

本実施例は、本発明の方法により得られた血小板多血漿と従来の遠心法により得られた血小板多血漿中に含まれるフィブリノゲン量を測定することを目的とする。

【0064】

次の4種の試料を調製した。試料1～3は実施例1の方法に従い、30分静置した。試料4は、ADC3.8w/v%を混入した水溶液0.85mLに血液を加え、全体を8.5mLとしたものをPR Pkit(クラサン株式会社)を用いて調製した。3600rpmで15分遠心後、さらに2400rpmで10分遠心し、上清を得た。

【0065】

試料1：コンロトール

試料2：PMB(8:2) 3mgをADC溶液0.15mLに溶かし、血液1.35mLと混合した。

試料3：従来法(遠心法)

【表5】

	試料1	試料2	試料3
フィブリノゲン (mg/dl)	212	214	184

【0066】

上記試料より得た上清について、フィブリノゲン量を測定した。測定は、ベーリングアーマンハイム製試薬を用いてトロンビン法により行った。その結果、試料1および2において高いフィブリノゲン値が得られた。このことから、本発明の方法により得られた血小板多血漿は高いフィブリノゲンを保有していることが確認された。

【産業上の利用可能性】

【0067】

以上説明したように、本発明の血小板多血漿の調製方法により、活性が高い血小板多血漿を、簡便に提供することができる。特に、自己の血液成分を原料として本発明の方法により得られた血小板多血漿が、組織および／または器官修復促進剤、具体的には歯科インプラント周囲の骨造成の添加剤、骨欠損部への骨もしくは人工骨の移植の際の添加剤、創傷治癒促進剤、形成および／または美容を目的とした治療後もしくは処置後の組織治癒促進剤、皮膚疾患治療剤、皮膚潰瘍治療剤、神経組織修復剤および／または外科手術後の組織修復剤として医療の現場で活用されうる。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】本発明の課題は、活性の高い血小板多血漿を容易にかつ安価に提供することである。

【解決手段】採血して得られた全血を、遠心分離によらず、選択促進的に赤血球を凝集沈降させることによる。例えば、有機リン酸化合物の残基を有するポリマー、具体的には有機リン酸化合物の残基を有するポリマーを全血に添加し、一定時間静置させると選択促進的に赤血球を凝集沈降させることができ、上清には生体内での血小板に近いインタクトな血小板を含み、血小板の他、フィブリノゲンを多く含む血漿成分や白血球を含めた血液成分を含む活性の高い血小板多血漿を得ることができる。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2004-024815
受付番号	50400162068
書類名	特許願
担当官	駒崎 利徳 8640
作成日	平成16年 2月16日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成16年 1月30日
【特許出願人】	
【識別番号】	502281493
【住所又は居所】	東京都世田谷区下馬3-20-10
【氏名又は名称】	角田 愛美
【代理人】	申請人
【識別番号】	100088904
【住所又は居所】	東京都千代田区岩本町3丁目2番10号 S N 岩本町ビル6F
【氏名又は名称】	庄司 隆
【選任した代理人】	
【識別番号】	100124453
【住所又は居所】	大阪府大阪市淀川区西中島5-6-13-307 新大阪御幸ビル ユニード国際特許大阪事務所
【氏名又は名称】	資延 由利子
【選任した代理人】	
【識別番号】	100129160
【住所又は居所】	東京都千代田区岩本町3-2-10 S N 岩本町 ビル6階 ユニード国際特許事務所
【氏名又は名称】	古館 久丹子

【書類名】 出願人名義変更届
【整理番号】 NP04-1003
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2004- 24815
【承継人】
 【識別番号】 000003159
 【氏名又は名称】 東レ株式会社
【承継人代理人】
 【識別番号】 100088904
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 庄司 隆
 【電話番号】 03-3864-6572
【選任した代理人】
 【識別番号】 100124453
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 資延 由利子
【選任した代理人】
 【識別番号】 100129160
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 古館 久丹子
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 067070
 【納付金額】 4,200円

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2004-024815
受付番号	50500088754
書類名	出願人名義変更届
担当官	関口 富夫 7563
作成日	平成17年 2月22日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成17年 1月19日
【承継人】	
【識別番号】	000003159
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
【氏名又は名称】	東レ株式会社
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	100088904
【住所又は居所】	東京都千代田区岩本町3丁目2番10号 S N 岩本町ビル6F
【氏名又は名称】	庄司 隆
【選任した代理人】	
【識別番号】	100124453
【住所又は居所】	大阪府大阪市淀川区西中島5-6-13-307 新大阪御幸ビル ユニード国際特許大阪事務所
【氏名又は名称】	資延 由利子
【選任した代理人】	
【識別番号】	100129160
【住所又は居所】	東京都千代田区岩本町3-2-10 S N 岩本町 ビル6階 ユニード国際特許事務所
【氏名又は名称】	古館 久丹子

ページ： 1

特願 2004-024815

出願人履歴情報

識別番号 [502281493]

1. 変更年月日 2002年 8月 2日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都世田谷区下馬 3-20-10

氏名 角田 愛美

ページ： 2/E

特願 2004-024815

出願人履歴情報

識別番号 [000003159]

1. 変更年月日 2002年10月25日

[変更理由] 住所変更

住所
東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
氏名 東レ株式会社